

## Akt 基因治疗大鼠肝硬化门静脉高压症

黄飞舟<sup>1</sup>, 邓刚<sup>1</sup>, 刘浔阳<sup>1</sup>, 罗成群<sup>2</sup>

(1. 湖南省肝硬化门脉高压症治疗研究中心, 长沙 410013;

2. 中南大学湘雅三医院烧伤整形科, 长沙 410013)

**[摘要]** 目的:探讨肝硬化时肝组织内 Akt 和 eNOS 的活化是否受到抑制以及腺病毒介导的 Akt 基因治疗门静脉高压症的可行性。方法:以细胞内同源重组法构建复制缺陷型重组腺病毒 Ad-myr-HA-Akt 和 Ad-EGFP。采用四氯化碳复合法制备肝硬化门静脉高压症大鼠模型。取 10 只正常大鼠作为对照,另取 40 只肝硬化大鼠随机均分为 4 组:未处理组、Akt 治疗组、EGFP 组和生理盐水组。后 3 组分别经尾静脉分别注射 Akt 重组腺病毒、Ad-EGFP 和生理盐水后,3 d 后,分别测定各组的门静脉压力、平均动脉压和心率。用免疫印迹法检测各组大鼠肝组织内 Akt, p-Akt, eNOS, p-eNOS 蛋白的表达;硝酸还原酶法检测各组肝内 NO 含量。EGFP 组于转染后 3 d 处死大鼠,取肝、心、肺、肾、脑、脾和睾丸,快速冰冻切片,观察绿色荧光蛋白的表达情况。结果:Ad-myr-HA-Akt 和 Ad-EGFP 经纯化后滴度分别为  $5.5 \times 10^{11}$  vp/mL 和  $6.0 \times 10^{11}$  vp/mL。肝硬化大鼠肝内 Akt 和 eNOS 的活化均受到抑制,肝内 NO 生成减少,门静脉压力升高。Akt 重组腺病毒治疗能使受到抑制的 Akt 和 eNOS 磷酸化得到恢复,同时增加肝内 NO 含量,降低门静脉压力。而经 Ad-EGFP 和生理盐水处理组,Akt 和 eNOS 磷酸化不能恢复,肝内 NO 含量和门静脉压力与未经治疗大鼠相似。EGFP 组在 Ad-EGFP 转染后 3 d 肝组织中可见大量绿色荧光,肺和肾组织中仅见少量荧光,而其他实质器官未见 EGFP 表达。结论:肝硬化时,大鼠肝内 Akt 和 eNOS 的活化均受到抑制,导致 NO 生成减少而肝内血管阻力增加,表现为门静脉压力升高。以腺病毒介导的 Akt 基因治疗门静脉高压症可行。

**[关键词]** Akt; eNOS; 腺病毒; 门静脉高压症; 基因治疗

**[中图分类号]** R657.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2008)01-0031-07

## Akt gene therapy for cirrhotic rats with portal hypertension

HUANG Fei-zhou<sup>1</sup>, DENG Gang<sup>1</sup>, LIU Xun-yang<sup>1</sup>, LUO Cheng-qun<sup>2</sup>

(1. Hepatic Cirrhosis and Portal Hypertension Center of Hunan Province; 2. Department of Burns and Plastic Surgery, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract:** **Objective** To determine whether there is an impaired Akt and eNOS activation in cirrhotic livers, and to investigate the feasibility of transferring adenovirus-mediated Akt gene to the liver for portal hypertension. **Methods** Recombinant adenovirus Ad-myr-HA-Akt and Ad-EGFP were produced by homologous recombination in 293 cells. The methods of compound factor, carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>), corn flour, and cholesterol plus alcohol were used to construct the hepatic cirrhosis rat models. Ten normal rats were served as a normal control group, and 40 cirrhotic rats were divided into 4 groups randomly: an untreated group, an Ad-myr-HA-Akt treated group, an Ad-EGFP group, and a saline group. Ad-myr-HA-Akt, Ad-EGFP, and saline were transduced into the Ad-myr-HA-Akt treated group, Ad-EGFP group, and saline group via the tail vein respectively.

收稿日期 (Date of reception) 2007-07-12

作者简介 (Biography) 黄飞舟(1961-),男,湖南邵阳人,博士,主任医师,主要从事肝硬化门脉高压症治疗的研究。

邓刚为并列第一作者。

通讯作者 (Corresponding author) 邓刚, E-mail: denggang9988@tom.com

Portal vein pressure, mean arterial pressure, and heart rate were measured in all rats. Protein abundance and phosphorylation status of Akt and eNOS were examined by Western blot. Spectrophotometry was used to measure the NO level. Frozen sections of the liver, heart, lung, kidney, brain, spleen, and testis were made to examine the expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) by fluorescence microscopy on Day 3 in the Ad-EGFP group. **Results** The concentration of recombinant adenovirus Ad-myr-HA-Akt after the purification was  $5.5 \times 10^{11}$  vp/mL and that of Ad-EGFP was  $6.0 \times 10^{11}$  vp/mL. Akt and eNOS phosphorylations in the liver of cirrhotic rats were obviously impaired. Adenoviral delivery of myr-Akt restored eNOS phosphorylation, increased the NO level and decreased the portal pressure after 3 days of adenoviral infection. In contrast, the livers infected with Ad-EGFP and saline were not changed. The EGFP expression was mainly found under the fluorescence microscopy on the frozen section of liver. Very little fluorescence was detected in the lung and kidney; and there was no detectable EGFP in other organs. **Conclusion** There is an impaired Akt and eNOS activation in the cirrhotic livers; *myr-Akt* gene therapy can restore the Akt activation and NO production in the cirrhotic liver, suggesting that this therapy may be helpful in treating portal hypertension.

**Key words:** Akt; eNOS; adenovirus; portal hypertension; gene therapy

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2008, 33(1):0031-07]

门静脉高压症是肝内血管阻力增加的结果<sup>[1]</sup>。肝内血管阻力增加一方面由肝硬化瘢痕组织和再生结节压迫肝窦血管引起,而另一重要的原因则是肝内一氧化氮(nitric oxide, NO)生成减少。Akt是内皮性一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的主要激活剂之一,但它在肝硬化时肝内阻力增加中的作用尚不明确。因此,本研究探讨肝硬化时,肝内Akt活化是否受到抑制,以及这种抑制是否造成eNOS受到抑制而影响NO的生成,从而加重门静脉高压;同时,我们以复制缺陷型腺病毒为载体,经尾静脉注射途径将编码持续活化Akt且带有HA标签(myr-HA-Akt)的基因导入肝硬化大鼠肝内,观察eNOS, NO的变化和门静脉压力的改变,为基因治疗门静脉高压症提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料与试剂 pcDNA3.1-myr-HA-Akt由美国纽约州立大学Buffloa Roswell Park研究所郭立武博士构建。重组腺病毒穿梭质粒pDC316, pBHGloxΔE1, 3Cre质粒为加拿大Microbix Biosystem公司产品。Lipofectamine2000™脂质体购自美国Invitrogen公司, HEK293细胞(人胚肾细胞)和含有报告基因绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的重组腺病毒Ad-EGFP购自本原正阳基因有限公司(病毒构建所采用的穿梭质粒和骨架质粒与本实验一致,病毒滴度为 $6.0 \times 10^{11}$  vp/mL)。NO测定试剂盒购自南京建成生物

工程研究所。限制性内切酶、T<sub>4</sub>DNA连接酶、DNA分子量Marker, 蛋白质Marker购自深圳晶美生物有限公司。免疫印迹(Western blot)所用试剂:蛋白提取试剂盒(美国Biovision公司), 一抗 anti-Akt, anti-eNOS, anti-phospho-Akt-Ser-473 (P-Akt), anti-phospho-eNOS-Ser-1177 (P-eNOS)(均购自美国Cell Signaling Technology公司)和 anti-HA(美国eBioscience公司)。二抗为HRP标记羊抗兔IgG(美国KPL公司)。LumiGLO化学发光底物(美国KPL公司)。PVDF膜(瑞士Roche公司), 内参β-actin(美国NeoMarkers公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 穿梭质粒的构建 用EcoRI/BamHI双酶切已构建好的pcDNA3.1-myr-HA-Akt质粒,回收小片段myr-HA-Akt;同时用EcoRI/BglII双酶切商品化穿梭质粒pDC316并回收载体,利用BamHI/BglII为同尾酶的特性将所得的小片段与回收的载体分别用T<sub>4</sub>DNA连接酶连接,即构建成穿梭载体pDC316-myr-HA-Akt。以EcoRI/SalI双酶切进行鉴定。

1.2.2 复制缺陷型腺病毒Ad-myr-HA-Akt的重组 转染前1d,将293细胞接种于六孔板中。待细胞生长至底面积的80%~90%时,每个转染孔取pBHGloxΔE1, 3Cre质粒4 μg, pDC316-myr-HA-Akt质粒1 μg,混匀。取10 μL Lipofectamine2000™脂质体以300 μL的DMEM培养液进行稀释,室温放置5 min。将上述两者混和,室温避光放置30 min。然后将混合物加入细胞中。转染后第2天,将长满的细胞传代于25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中,每天观察

细胞病变反应 (cytopathic effect, CPE)。细胞病变反应为细胞变大变圆,呈葡萄状,并开始出现明显噬斑。待细胞大部分病变后从底部脱落进行收毒。将出毒的细胞培养瓶先后置于  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱和  $37^{\circ}\text{C}$  水浴锅中反复冻融 3 次,  $3\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心,收集含病毒的上清液。该上清即作为随后病毒扩增的毒种。

1.2.3 重组腺病毒 Ad-myr-HA-Akt 的扩增、纯化及鉴定 Ad-myr-HA-Akt 的扩增、纯化依说明书进行。感染性鉴定:用待鉴定的腺病毒感染 HEK293 细胞,在感染后 5~6 d 出现典型的细胞病变反应,可初步判断为腺病毒。PCR 扩增外源基因片段的鉴定:扩增 myr-HA-Akt 片段,根据 Akt 上游前导肽的编码序列及 Akt 之 CDS 下游序列合成上、下游引物 (Invitrogen 公司合成);即 myr-HA-Akt-Up,  $5'-\text{GGGAATTCATGGGATGCGTGTGTAGC}-3'$ ; Akt-Down,  $5'-\text{GGGATCCTCAGCCGTGCCGCTGGC-CGAGTA}-3'$ 。

1.2.4 重组腺病毒的滴度测定 采用 TCID50 法测定。

1.2.5 动物模型制备及分组 雄性 SD 大鼠 60 只,体质量  $220 \pm 20\ \text{g}$  (湖南农业大学实验动物中心提供),12 h 光照和 12 h 黑暗交替。随机取 10 只正常大鼠作为正常对照组,自由进食标准颗粒饲料及饮水。其余 50 只按照动物实验方法学<sup>[2]</sup>,采用四氯化碳复合法制备动物模型。大鼠皮下注射 40% 四氯化碳-花生油溶液  $0.3\ \text{mL}/100\ \text{g}$  体质量,每周 2 次。第 2 周开始,以 10% 酒精作为惟一饮料,自由饮用。饲以混有 0.5% 胆固醇纯玉米粉饲料,8 周成模。随机挑选 3 只门静脉高压症成模大鼠取肝组织右叶约 10 g,采用 HE 常规染色和标准 Van Gieson (VG) 胶原染色,光镜下观察肝细胞变性、坏死、炎症细胞浸润及胶原沉积情况。另取 40 只肝硬化大鼠随机分成 4 组:肝硬化未处理组 (简称未处理组)、Akt 重组腺病毒治疗组 (简称 Akt 治疗组)、EGFP 组和生理盐水组。

1.2.6 Akt 重组腺病毒、EGFP 报告病毒、生理盐水导入 肝硬化形成 1 周后,Akt 治疗组、EGFP 组和生理盐水组自尾静脉分别注射  $3.0 \times 10^{11}\ \text{vp}$  的 Akt 重组腺病毒<sup>[3]</sup>、 $3.0 \times 10^{11}\ \text{vp}$  的 EGFP 报告病毒及等容积的生理盐水。

1.2.7 测压及标本采集 正常对照组和肝硬化大鼠在经尾静脉注射后 3 d<sup>[3]</sup>,大鼠禁食 12 h,不禁饮水,用 RBP-1 型大鼠血压测定仪测定鼠尾平均动脉压 (MAP) 和心率 (HR)。以水合氯醛麻醉后,剖腹,门静脉插管,测门静脉压力 (PVP),并取肝组织,置于液氮中保存。

1.2.8 免疫印迹法检测 Akt, p-Akt, eNOS, p-eNOS, HA 蛋白的表达 取适量组织按体积比 1:5 加入组织细胞裂解液,电动匀浆后冰置 30 min,  $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$   $4^{\circ}\text{C}$  离心 40 min,取上清,用 Bradford 法测蛋白浓度,根据目的蛋白相对分子质量配制 SDS-PAGE 凝胶,调整上样量为  $40\ \mu\text{g}$  进行电泳。常规湿转膜操作。

1.2.9 肝组织 NO 含量测定 取液氮保存的大鼠肝脏 1 g,  $4^{\circ}\text{C}$  下加生理盐水制成  $100\ \text{g}/\text{L}$  的匀浆,  $1\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 5 min 后取上清,以硝酸还原酶法测 NO 代谢产物  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  间接反映 NO 水平。

1.2.10 EGFP 表达的测定 EGFP 组于转染后 3 d,待门静脉压力测定后,即处死大鼠,取心、肝、脾、肺、肾、脑及睾丸,等渗盐水漂洗,快速冰冻包埋,连续切片,荧光显微镜下观察 EGFP 的表达情况。

1.3 统计学处理 结果用均数  $\pm$  标准差表示,采用 SPSS11.0 统计分析软件包进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 穿梭质粒的构建 构建的穿梭质粒 pDC316-myr-HA-Akt 经 *EcoRI/SalI* 双酶切和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,出现预期大小的特异性目的条带 (pDC316 质粒  $3\ 913\ \text{bp}$ , myr-HA-Akt  $1\ 506\ \text{bp}$ ) (图 1)。

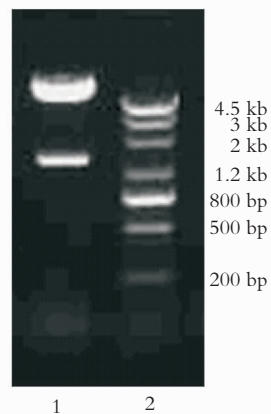


图 1 含有 myr-HA-Akt 片段的 pDC316 酶切鉴定 1: pDC316-myr-HA-Akt 经 *EcoRI/SalI* 双酶切后产生的条带; 2: Marker4500

Fig. 1 Identification of pDC316-myr-HA-Akt plasmid by restriction enzyme digestion 1: pDC316-myr-HA-Akt digested with *EcoRI/SalI*; 2: Marker4500

## 2.2 重组腺病毒 Ad-myr-HA-Akt 的鉴定

2.2.1 感染性鉴定 用含目的片段的穿梭质粒和 pBHGlox $\Delta$ E1,3Cre 质粒共转染后 7 d, 培养板内 HEK293 细胞出现典型细胞病变效应(图 2)。

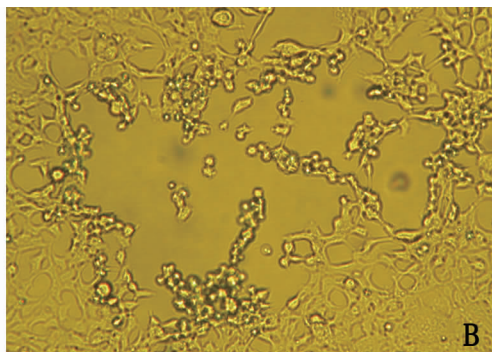
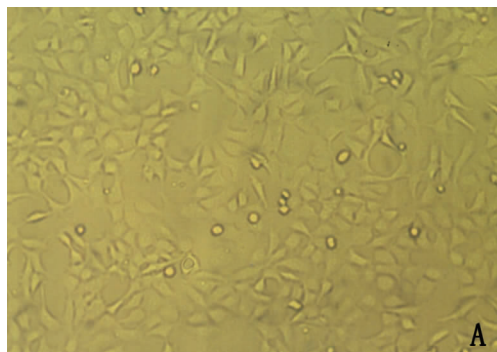


图 2 Ad-myr-HA-Akt 重组腺病毒感染 293 细胞形态改变( $\times 200$ ) A: 正常 293 细胞; B: 感染 Ad-myr-HA-Akt 重组腺病毒的 293 细胞

Fig.2 Cytopathic effect of 293 cells infected with Ad-myr-HA-Akt( $\times 200$ ) A: Normal 293 cells; B: 293 cells infected with Ad-myr-HA-Akt

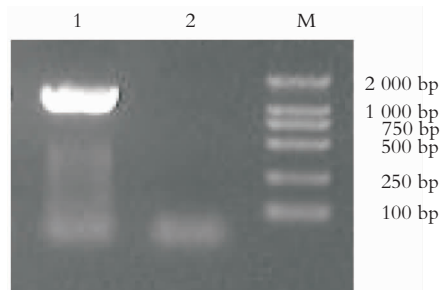


图 3 myr-HA-Akt 的 PCR 鉴定 1: Ad-myr-HA-Akt; 2: 阴性对照; M: DL2000 marker

Fig.3 PCR detection of myr-HA-Akt gene in recombinant adenovirus 1: Ad-myr-HA-Akt; 2: Negative control; M: DL2000 marker

2.2.3 重组腺病毒的滴度测定 Ad-myr-HA-Akt 扩增后, 经 TCID<sub>50</sub> 法测定滴度为  $5.5 \times 10^{11}$  vp/mL。

2.2.4 肝硬化门静脉高压症大鼠肝脏病理形态学改变 正常组肝小叶形态无异常, 未见肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润, VG 染色未见纤维间隔形成; 模型组肝小叶正常结构消失, 有大量炎症细胞浸润, 可见肝细胞变性、坏死, VG 染色可见纤维间隔, 假小叶形成(图 4)。

2.3 治疗结束时各组门静脉压力、平均动脉压和心率的测定 治疗结束各组 PVP, MAP 和 HR 测定结果未处理组、EGFP 组和生理盐水组 PVP 显著

2.2.2 PCR 扩增外源基因片段的鉴定 在所包装的病毒 DNA 中都扩增出了与理论大小相同的目的片段(1 506 bp)(图 3)。

高于正常组 ( $P < 0.05$ ), MAP 和 HR 无明显变化, Akt 治疗组 PVP 比未处理组、EGFP 组和生理盐水组明显降低 ( $P < 0.05$ ), MAP 和 HR 均无明显变化(表 1)。

表 1 治疗结束时各组门静脉压力、平均动脉压和心率的测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Results of PVP, MAP, and HR in each group at the end of treatment( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	PVP(mmHg)	MAP(mmHg)	HR(次/min)
正常对照组	10	7.32 $\pm$ 1.03 *	86.7 $\pm$ 12.6	305 $\pm$ 62
未处理组	10	16.22 $\pm$ 0.96	87.5 $\pm$ 11.3	327 $\pm$ 73
Akt 治疗组	10	8.73 $\pm$ 1.20 #	85.0 $\pm$ 13.6	298 $\pm$ 55
EGFP 组	10	15.79 $\pm$ 1.17	80.1 $\pm$ 17.9	323 $\pm$ 49
生理盐水组	10	16.03 $\pm$ 1.12	82.6 $\pm$ 15.2	312 $\pm$ 70

与未处理组、EGFP 和生理盐水组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与未处理组、EGFP 和生理盐水组比较, #  $P < 0.05$

2.4 蛋白质印迹检测 肝硬化大鼠 Akt 和 eNOS 磷酸化水平降低, 经尾静脉注射途径将编码持续活化 Akt 且带有 HA 标签 (myr-HA-Akt) 的基因导入肝硬化大鼠体内, 能够明显恢复 Akt 和 eNOS 磷酸化; 而经 Ad-EGFP 和生理盐水处理组, Akt 和 eNOS 磷酸化不能恢复。Akt 治疗组见 HA 蛋白表达, 而其他组未见表达(图 5)。



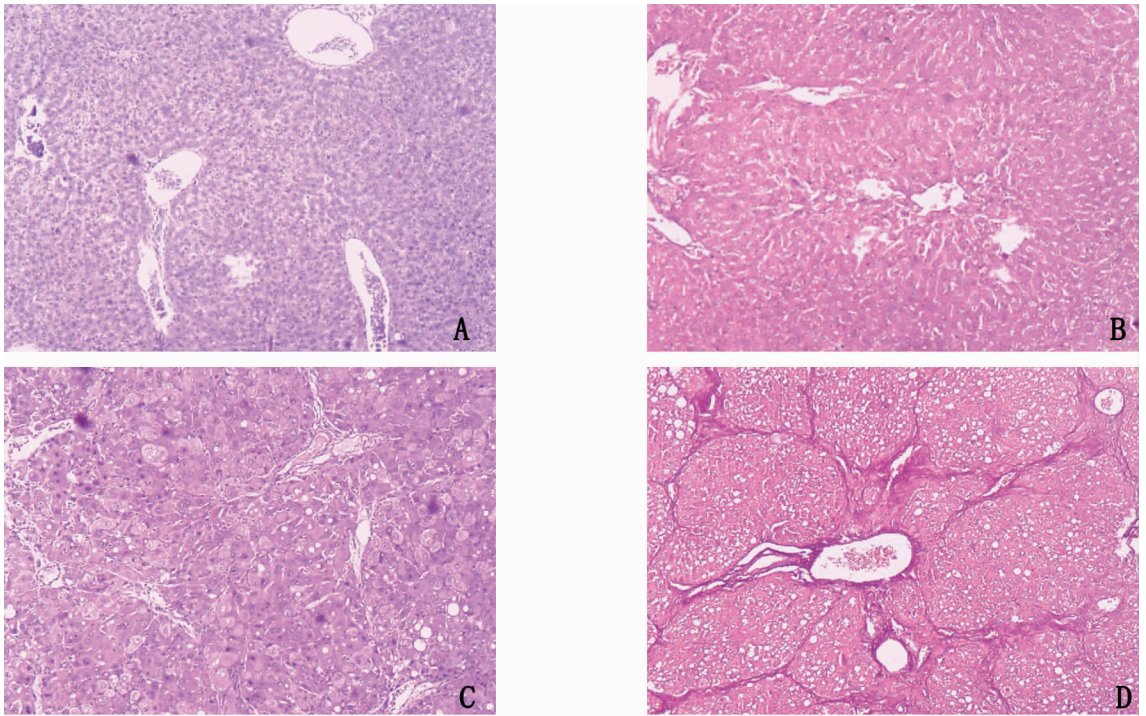


图4 肝硬化大鼠肝脏病理形态学改变 A: 正常组(HE × 100); B: 正常组(VG × 40); C: 肝硬化组(HE × 100); D: 肝硬化组(VG × 40)

Fig. 4 Pathological changes of liver tissues A: Normal tissues (HE × 100); B: Normal tissues (VG × 40); C: Cirrhosis tissues (HE × 100); D: Cirrhosis tissues (VG × 40)

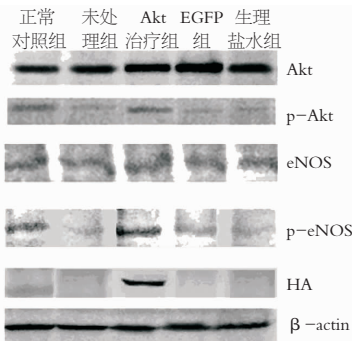


图5 免疫印迹法检测各组大鼠肝组织内 Akt, p-Akt, eNOS, p-eNOS 蛋白的表达

Fig. 5 Western blot protein abundance and phosphorylation status of Akt and eNOS

2.5 肝组织 NO 含量测定 测定结果正常组肝组织 NO 含量  $[(2.68 \pm 0.60) \mu\text{mol/g}]$  显著高于未处理组  $[(0.92 \pm 0.71) \mu\text{mol/g}]$ 、EGFP 组  $[(1.21 \pm 0.65) \mu\text{mol/g}]$  和生理盐水组  $[(1.06 \pm 0.62) \mu\text{mol/g}]$  ( $P < 0.05$ )，Akt 治疗组肝组织 NO 含量  $[(2.55 \pm 0.56) \mu\text{mol/g}]$  比未处理组、EGFP 组和生理盐水组明显增高 ( $P < 0.05$ )。

2.6 EGFP 表达的检测 Ad-EGFP 转染后 3 d 肝组织中可见大量绿色荧光,肺和肾组织中仅见少量荧光,而其他实质器官未见 EGFP 表达(图6)。

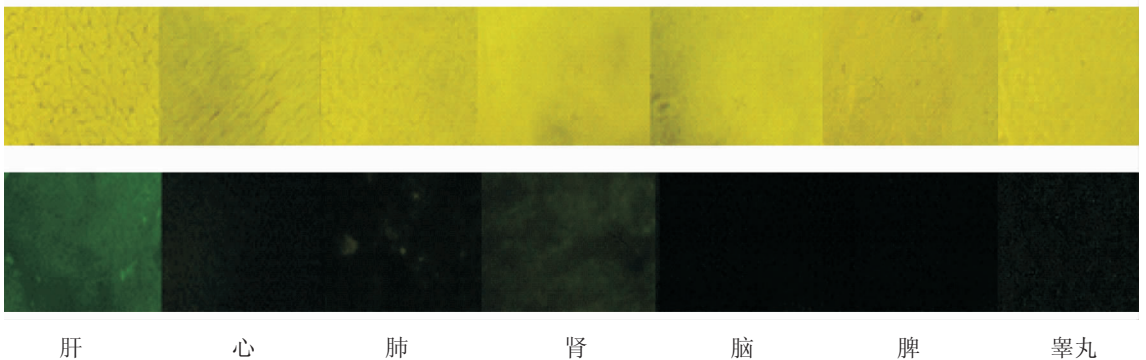


图6 EGFP 在 EGFP 组大鼠体内的分布情况

Fig. 6 Expression of EGFP in the EGFP group

### 3 讨 论

肝内血管阻力增加是肝硬化门静脉高压的始动因素<sup>[1]</sup>。由肝硬化瘢痕组织和再生结节压迫肝窦血管引起的机械性阻力相对稳定且不可逆,而由血管活性物质引起的功能性阻力可逆并可进行有效调节。NO 作为最重要的内源性血管扩张物质,参与肝硬化高动力循环状态的形成。内源性 NO 增加可引起内脏血管扩张,而肝内 NO 产生减少则增加肝内血管阻力,这些与门脉高压的形成和发展有密切关系。

动物实验以及肝窦内皮细胞实验表明,在肝硬化时,NO 产量和 eNOS 的活性均降低<sup>[4,5]</sup>。越来越多的证据显示蛋白质磷酸化作用对 eNOS 的活性起着重要作用,PI3/Akt 信号传导途径在活化 eNOS 过程中发挥着重要作用。在 Akt 调节 eNOS 的过程中,丝氨酸 1179 (Ser1179) 是重要的调节位点(人的 Ser1177 与牛的 Ser1179 相对应)。Akt 通过对 eNOS 的 Ser1179 位点磷酸化即可活化 eNOS,从而使 NO 产量增加<sup>[6,7]</sup>。

本研究证实,在肝硬化大鼠肝脏内,Akt 活化受到抑制(表现为磷酸化 Akt 含量显著降低),导致 eNOS 的活化受到损害(表现为磷酸化 eNOS 含量显著降低),从而减少 NO 生成而增加肝内血管阻力,表现为门静脉压力升高。基于这一现象,笔者以复制缺陷型腺病毒为载体经尾静脉注射途径将编码持续活化 Akt 的基因导入肝硬化大鼠肝内,3 d 后即能使受到抑制的 Akt 和 eNOS 磷酸化得到恢复,同时可检测出肝内 NO 含量增加,门静脉压力降低。而经 Ad-EGFP 和生理盐水处理组,Akt 和 eNOS 磷酸化不能恢复,肝内 NO 含量和门静脉压力与未经治疗大鼠相似。

与其他病毒载体相比,腺病毒载体具有许多独特的优点:(1)腺病毒粒子相对稳定,病毒基因组重排频率低,外源基因插入片段在病毒复制几个周期后仍可保持不变,易于用重组 DNA 技术操作;(2)安全性较好,腺病毒无需整合进宿主细胞基因组中,目的基因在宿主细胞基因组外游离状态下表达,整合突变致癌可能性小,基因毒性低;(3)腺病毒基因组较大(536 kb),绝大多数基因组(约 35 kb)均能被外源基因取代,插入大片段外源性基因的潜力大;(4)有较大的宿主范围,对于受体细胞是否处于分裂期要求不严格;(5)腺病毒载体容易将外源基因直接转移到靶细胞中,并有效表达成活性蛋白。本研究使用的是已被批准使用于临床的 E1 和 E3 区缺乏的复制缺陷性腺病

毒载体,这种载体无编码序列,减轻了腺病毒感染时出现的炎性反应和免疫反应<sup>[8-11]</sup>。

本研究所采用的腺病毒除了具有上述优点外,还具有良好的靶向性<sup>[8-9,11]</sup>。携带报告基因的 Ad-EGFP 病毒经尾静脉注射后 3 d 肝组织中可见大量绿色荧光,肺和肾组织中仅见少量荧光,而其他实质器官未见 EGFP 表达,说明腺病毒具有强烈的嗜肝性,可保证携带 myr-HA-Akt 基因腺病毒的安全性。这一点在经尾静脉途径注射 Ad-myr-HA-Akt 后,肝硬化大鼠仅出现门静脉压力显著下降,而体循环参数基本不变的结果得到了证实。

综上所述,肝硬化时,大鼠肝内 Akt 和 eNOS 的活化均受到抑制,其结果是 NO 生成减少而肝内血管阻力增加,表现为门静脉压力升高。而以腺病毒介导的靶向 Akt 基因治疗肝硬化门静脉高压症可行。

**致谢:**美国纽约州立大学 Buffalo Roswell Park 研究所郭立武博士为本实验研究构建了质粒 pcDNA3.1-myr-HA-Akt,谨致谢意。

#### 参考文献:

- [1] Bosch J, Garcia-Pagan J C. Complications of cirrhosis: I. Portal hypertension [J]. *J Hepatol*, 2000, 32 (Suppl 1): 141-156.
- [2] 孙敬方. 动物实验方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2005: 474-475.  
SUN Jing-fang. *Methodology of Animal Experimentation* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 474-475.
- [3] Garcia-Bañuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, et al. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversal [J]. *Gene Ther*, 2002, 9 (2): 127-134.
- [4] Gupta T K, Toruner M, Chung M K, et al. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats [J]. *Hepatology*, 1998, 28 (4): 926-931.
- [5] Rockey D C, Chung J J. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114 (2): 344-351.
- [6] Urano A, Sugawara A, Kanatsuka H, et al. Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway [J]. *Circulation*, 2005, 112 (5): 727-736.
- [7] Sun Y, Sumi D, Kumagai Y. Serine-1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase caused by 2,4,6-trinitrotoluene through PI3K/Akt signaling in endothelial cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 214 (1): 55-60.
- [8] Barnett B G, Crews C J, Douglas J T. Targeted adenoviral vectors [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1575 (1-3):

114.

- [9] Kinoshita K, Iimuro Y, Fujimoto J, et al. Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre/loxP system to antagonise hepatic fibrosis [J]. *Gut*, 2007, 56(3):396-404.
- [10] Bueno M, Salgado S, Beas-Zúrate C, et al. Urokinase-type plasminogen activator gene therapy in liver cirrhosis is mediated by collagens gene expression down-ulation and up-regulation of

MMPs, HGF and VEGF [J]. *J Gene Med*, 2006, 8(11): 1291-1299.

- [11] Lin Y, Xie W F, Chen Y X, et al. Treatment of experimental hepatic fibrosis by combinational delivery of urokinase-type plasminogen activator and hepatocyte growth factor genes [J]. *Liver Int*, 2005, 25(4):796-807.

(本文编辑 陈丽文)

# 《中南大学学报(医学版)》 征 稿 启 事

《中南大学学报(医学版)》原名《湖南医科大学学报》,创刊于1958年,为教育部主管、中南大学主办的高级医药卫生类综合性学术期刊。本刊是中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊;多次被国家和省部级新闻和出版部门评为优秀科技期刊;已被美国医学文献分析和联机检索系统(MEDLINE)及其《医学索引》(IM),荷兰《医学文摘》(EM),美国《化学文摘》(CA),俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI),中国科学引文数据库(核心库)(CSCD)等国内外多家重要数据库和权威文摘期刊收录。

本刊辟有述评、论著、综述、病例报告、科研快报等栏目。现面向全国高等医药院校、医药卫生系统和海外相关研究机构的作者征集优秀的中、英文稿件,尤其欢迎国家攻关项目、重点科研项目及重大基金资助课题的有关研究论文,本刊已设置相关研究报道专栏,并为优质稿件开设“绿色通道”。本刊稿约见本刊网站:  
[Http://xbyx.xysm.net](http://xbyx.xysm.net)。

地址:湖南省长沙市湘雅路110号湘雅医学院75号信箱

邮编:410078

电话:0731-4805495;0731-4805496

传真:0731-4804351

E-mail: xyxb2005@vip.163.com; xyxb2005@126.com

**投稿网址: [Http://xbyx.xysm.net](http://xbyx.xysm.net)**